◆トピックス◆

血小板膜抗原—最近の話題—

降旗謙一*

Current Topics on Platelet Membrane Antigens

Kenichi FURIHATA

Key words: platelet specific antigens, ITP, platelet alloantigens

血小板膜上には、表1に示したように種々の抗原系が存在するが、臨床的に重大な問題となるのは自己抗原と同種抗原である。自己抗原に関しては特発性血小板減少性紫斑病 (Idiopathic (or Immune) Thrombocytopenic Purpura: ITP) においてもっとも詳しく研究されており、血小板膜糖蛋白 (glycoprotein: GP) IIb-IIIa および GPIb-IX が自己抗原として非常に重要であることがわかってきた。一方、同種抗原は新生児同種免疫性血小板減少性紫斑病 (Neonatal Alloimmune Thrombocytopenic Purpura: NATP) や輸血後紫斑病 (Posttransfusion Purpura: PTP)、血小板輸血不応状態 (Platelet Transfusion Refractoriness: PTR) の原因として最近注目されている。本稿ではこれらの自己抗原および同種抗原に関する比較的最近のトピックスを紹介する。

1. 自己抗原

ITP は200年も前から自然に出血や点状出血斑、紫斑などをきたす症候群として知られており、1950年代に Harrington ら¹⁾ によって免疫学的な血小板の破壊がその発症の原因だと判明した。

自己抗原の血小板膜上の局在に関する検討は1980年代になって始まった。まず van Leeuwen ら²⁾ により42の ITP 患者血清のうち

35が正常の血小板に対しては反応するが I 型血小板無力症患者の血小板には反応しないと報告された。I 型血小板無力症は GPIIb-IIIa を欠損しているの、この報告によって ITP における自己抗原の大部分が GPIIb-IIIa 上にある可能性が示された。次いで Woods ら³⁾ がモノクローナル抗体を使った RIA や immuno-precipitation によって同じ結果を得た。さらに Beardsley ら⁴⁾ および降旗ら⁵⁾ は Western blotting によって GPIIIa が一部の ITP における自己抗原となっていることを示した。また、GPIIb-IIIa と並んで重要な血小板膜糖蛋白である GPIb-IX も自己抗原となることが Woods ら⁶⁾ および Szatkowski ら⁷⁾ によって示され、このタイプの ITP は非常に重症型が多い印象がもたれた。最近モノクローナル抗体を利用した抗血小板抗体の検出法が開発され、抗体の検出率も上がっているが、Kiefel ら⁸⁾ は MAIPA 法により ITP の自己抗体の対応抗原を検討した結果 GPIb-IX も GPIIb-IIIa と同様に高頻度に自己抗原となることを示した。以上は主として成人に見られる慢性型 ITP に関する検討であるが、小児に多い急性型 ITP では自己抗原として GPV も注目されている。⁹⁾ そのほかの GP や glycosphingolipids に対する自己抗体も報告されているが、それらを含む自己抗原の一般的なことに関

* 信州大学附属病院輸血部 [〒390 松本市旭 3-1-1]; 3-1-1 Asahi Matsumoto Nagano 390, Japan. Transfusion Service, Shinshu University Hospital

表 1 血小板膜抗原系

抗原系	主要関連疾患	主要な抗原
1. 自己抗原	a) 慢性, 急性 ITP b) SLE	GPIb-IX, GPIIb-IIIa, GPV 66kDa, 120kDa
2. 同種抗原	輸血後紫斑病, NATP ¹⁾ および血小板輸血不応状態	血小板特異抗原, 血液型抗原 および HLA class I 抗原
3. 薬剤性抗原	a) キニン, キニジン性 b) ヘパリン性	GPIb-IX, GPIIb-IIIa Fc receptor, GP I b?
4. 活性化抗原 ²⁾	a) MoAbs: PAC-1, 7E3, 5E5 b) S12, KC4	GPIIb-IIIa ³⁾ GMP-140 (PADGEM)

¹⁾: neonatal alloimmune thrombocytopenic purpura

²⁾: activation-specific platelet antigens

³⁾: conformationally changed GPIIb-IIIa

しては, Beardsley の総説が詳しい.¹⁰⁾

ITP の研究における最近のトピックスとして Nugent と Kunicki の研究を紹介する。まず, 抗 GPIb-IX 自己抗体に関する Nugent¹¹⁾ の興味深い研究を紹介する。彼女は以前より抗 GPIb-IX 自己抗体により発症した重症型 ITP 患者 (DM) のリンパ球を用いてヒト型モノクローナル抗体を作製していたが, 最近 DM の抗 GPIb-IX 自己抗体を免疫源として rabbit polyclonal および murine monoclonal anti-idiotypic antibodies (Mu anti-id) を作製した。これらの抗体を capturing antibody として用いて 300 症例近い ITP 患者血清および正常血清を ELISA 法で screening した結果, 抗血小板自己抗体の GPIb に対する反応性と DM idiotype との間に非常に強い相関があることがわかった。つまり, 特異性が判明した自己抗体のうち GPIb を認識するものはすべて DM idiotype 陽性で, ほかの抗原を認識する抗体は陰性であった。彼女はさらに 10 種類の Mu anti-id を用いて抗 GPIb 自己抗体を分類し検討している。Kiefel ら⁹⁾ によると抗 GPIb 自己抗体による ITP は当初考えられたより頻度が高く, また Nugent の症例 (DM) や Szatkowski らの症例のような重症型のみではなさそうである。しかし, このように Mu anti-id などにより抗 GPIb 自己抗体による ITP をさらに分類し, DM のような重症型の症例を早期に診断し, 適切な治療方針を立てられるようになる可能性がある。また, このようなアプローチから抗 GPIb 自己抗体産生の機序に迫れ

る可能性や, idiotype-antiidiotype network により ITP の治療やコントロールができる可能性も期待できる。

この Nugent らの研究をさらに推し進めたのが Kunicki らによるヒトモノクローナル抗体の作製とその分子生物学的解析である。彼らは Nugent の ITP 患者 DM のリンパ球を Epstein Barr virus を用いて transform し, さらに human-mouse heteromyeloma line である F6 と fusion してハイブリドーマを作製した。その結果得られたヒトモノクローナル抗体のひとつである 2E7 は GPIIb alpha に結合する¹²⁾。彼らは 2E7 の epitope に関して詳細に検討し, その認識する GPIIb alpha 上での正確なアミノ酸配列を決定した。次いで, 2E7 の heavy chain と light chain をコードする遺伝子をクローニングし, その塩基配列も決定している (personal communication)。Nugent らの idiotype に関する検討とならび, このような molecular biology を取り入れた研究が今後自己抗原の分野でも主体となり, ITP などの発症のメカニズムに迫り, さらに新しい治療法の確立につながると期待される。

2. 同種抗原

血小板膜上の主要な同種抗原としては, まず HLA class I 抗原といわゆる血小板特異抗原とが挙げられるが, 本稿ではその後者に関して 1990 年 6 月にバルセロナで開催された国際血栓止血学会の Scientific and Standardization Committee における話題を紹介する。

表 2 Expression of Platelet Allotigens Among Orientals

Antigen system	Antigens	Other names	Phenotypic Japanese*	frequency (%) Korean**
HPA-1	HPA-1a 1b	Zw ^a , PI ^{A1}	>99.9	100
		Zw ^b , PI ^{A2}	< 3.7***	2.1
HPA-2	HPA-2a 2b	Ko ^b , Sib ^b	98.0	n.t.
		Ko ^a , Sib ^a	27.1	19.1
HPA-3	HPA-3a 3b	Bak ^a , Lek ^a	78.9	78.7
		Bak ^b	n.t.	n.t.
HPA-4	HPA-4a 4b	Pen ^a , Yuk ^b	99.9	100
		Pen ^b , Yuk ^a	1.7	2.1
HPA-5	HPA-5a 5b	Br ^b , Zab ^b	100	n.t.
		Br ^a , Zab ^a , Hc ^a	5.8	n.t.

*: data provided by Japanese Workshop on Platelet Serology

**: data provided by Dr. K.S. Han, Korea, n=47

***: no PI^{A2} positive individuals in 6,000 Japanese screened

Newman は今までに polymerase chain reaction (PCR) を用いて同種抗原系の PI^A と Bak における polymorphism を DNA のレヴェルで決定したが¹³⁾¹⁴⁾, 今回 PI^A の polymorphism に関して genomic DNA を使って typing することを試みた. まず GPIIIa をコードする genomic DNA の sequence を参考に PI^A の polymorphism のある 33 番目のアミノ酸をコードする exon 内で一組の primer を作製した. この primer を用いて PCR により必要な部分の DNA を増幅し, ドットハイブリダイゼーション法により typing した. プローブとしては polymorphism 部位に結合する PI^{A1} と PI^{A2} 用の一組の合成オリゴヌクレオチドに digoxigenin を結合させたものを用いた. 発色はアルカリフォスファターゼ結合抗 digoxigenin 抗体をプローブに反応させ, 基質を加えて行った. この方法でミルウォーキーの血液センターの McFarland らと NATP 症例の PI^A に関する typing を臍帯血を用いて実施した所, ELISA 法による typing の結果と完全に一致する良好な結果が得られた. さらにこの方法は下記のような利点があった.

1) 血小板も抗血清も不要である.

2) NATP の新生児は血小板減少の状態であるが, この方法の材料 (臍帯血) の入手は容易

である.

3) 新生児に検査材料の入手のためのリスクを与えない.

現在 specificity と affinity の高い同種抗体を十分量確保することが非常に困難であるため, この方法は一部の施設に急速に普及するものと思われる.

次いで人種による血小板特異抗原の表現型頻度の違いに関して発表があり, 注目された点は, GPIIIa 上の PI^A と Yuk 以外に GPIa 上の Br も人種間で表現型頻度が異なることが明らかとなったことである. フランスや西独では Br^a の頻度が約 20% であるのに対し, スペインでは約 40% と非常に高率で, 一方日本では 5.8% (長野県では 11.9%) と低率であった. なお, チリの Mapuches Indian における Br^a の頻度は 4.9% と報告されている.¹⁵⁾ また PI^A に関しても, 日本人では PI^{A2} 陽性の人は見つかっていないが, 韓国ではソウル大学のハンの報告によると 47 人中 1 人が PI^{A2} 陽性であった (PI^{A1}/PI^{A2}) という. 白人と比較すると非常に低い値であるが, 日本人の 0 とは明らかに異なり興味深い (表 2 参照).

最後に池田ら¹⁶⁾ によって発見された血小板同種抗原の Nak^a が isoantigen である可能性が報告された. この Nak^a 抗原が GPIV に局

在することは富山¹⁷⁾によって報告されているが、その後柴田¹⁸⁾によって抗 Nak^a 抗体と抗 GPIV モノクローナル抗体である OKM 5 の反応性が MPHA で検討した結果完全に一致することが確認された。第 3 回日本血小板型ワークショップにおいて池田らは OKM 5 と抗 Nak^a がお互いに Nak^a 陽性血小板への結合をブロックすることを flow cytometry で示した。さらに山本らは crossed immunoelectrophoresis, immunoprecipitation, two dimensional SDS-PAGE などで Nak^a 陰性の血小板が GPIV を欠損していることを示した。彼ら¹⁹⁾によると、アメリカ人では Nak^a 陰性の頻度は 3/871 (0.34%) であり、日本人の約 3%¹⁶⁾ よりはるかに低いようである。なお、Nak^a 陰性者は明らかな出血症状は示していない。これらの結果がまとめてバルセロナでも報告された。

以上血小板膜抗原に関する最近のトピックスを簡単に紹介した。自己抗原に関しても、同種抗原に関しても、1980 年代は immunochemistry が中心で抗原の局在が明らかになったり、検査法が開発され、新しい同種抗原系が次々と発見された。1990 年代はほかの分野と同様 molecular biology が中心となってこの分野の研究をリードして行くものと思われる。しかし、珍しい症例や抗体の発見は依然として血清学的検査が中心であり、補助として immunochemistry も重要であろう。最近のこの分野での日本人研究者の活躍は目覚ましく、1990 年代も引き続き健闘を期待したい。

文 献

- Harrington, W. J., Minnich, V., Hollingsworth, J. W., Moore, C. V.: Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med* **38**: 1, 1951.
- van Leeuwen, E. F., van der Ven, JThM, Engel-friet, C. P., von dem Borne, AEGKr: Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood* **59**: 23, 1982.
- Woods, V. L. Jr., Oh, E. H., Mason, D., McMillan, R.: Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb-IIIa complex in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* **63**: 368, 1984.
- Beardsley, D. J. S., Spiegel, J. E., Jacobs, M. M., Handin, R. I., Lux, S. E.: Platelet membrane glycoprotein IIIa contains target antigens that bind anti-platelet antibodies in immune thrombocytopenias. *J Clin Invest* **74**: 1701, 1984.
- 降旗謙一: 慢性特発性血小板減少性紫斑病における抗血小板抗体対応抗原に関する研究. *慶応医学* **61**: 537, 1984.
- Woods, V. L., Kurata, Y., Montgomery, R. R., Tani, P., Mason, D., Oh, E. H., McMillan, R.: Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood* **64**: 156, 1983.
- Szatkowski, N. S., Kunicki, T. J., Aster, R. H.: Identification of glycoprotein Ib as a target for autoantibody in idiopathic (autoimmune) thrombocytopenic purpura. *Blood* **67**: 1986.
- Kiefel, V., Santoso, S., Mueller-Eckhardt, C.: Diversity of target antigens in autoimmune thrombocytopenia. *Blood* **74**(Suppl): 147a, 1989.
- Beardsley, D. J. S., Ho, J., Beyer, E. C.: Varicella associated thrombocytopenia: Antibodies against an 85kD thrombin sensitive protein (? GPV). *Blood* **66**(Suppl): 1030a, 1985.
- Beardsley, D. J.: Platelet autoantigens. In: *Platelet Immunobiology. Molecular and Clinical Aspects*. Eds. Kunicki TJ and George JN Lippincott Co. Philadelphia. pp121, 1989.
- Nugent, D. J.: Identification of antiplatelet antibody idiotypes associated with glycoprotein Ib specificity, present in plasma and produced by human EBV transformed B cell lines from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). *Tromb Hemcost* **62**: 150, 1989.
- Kunicki, T. J., Furihata, K., Kekomaki, R., Scott, J. P., Nugent D. J.: A human monoclonal antibody specific for human platelet glycoprotein IIb (Integrin alpha_{IIb}) heavy chain. *Human antibodies and hybridomas* **1**: 83, 1990.
- Newman, P. J., Derves, R. S., Aster, R.H.: The human platelet alloantigen, Pl^{A1} and Pl^{A2}, are associated with a leucine³³/proline³³ amino acid

- polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* **83**:1778, 1989.
- 14) Lyman, S., Aster, R. H., Visentin, G. P., Newman, P. J.: Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Bak^a/Bak^b alloantigen system. *Blood* **75**:2343, 1990.
- 15) Inostroza, J., Kiefel, V., Mueller-Eckhardt, C.: Frequency of platelet-specific antigens PI^{A1}, Bak^a, Yuk^a, Yuk^b, and Br^a in South American (Mapuches) Indians. *Transfusion* **28**:586, 1988.
- 16) Ikeda, H., Mitani, T., Ohnuma, M., Haga, H., Ohtzuka, S., Kato, T., Nakase, T., Sekiguchi, S.: A new platelet-specific antigen, Nak^a, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion. *Vox Sang* **57**:213, 1989.
- 17) Tomiyama, T., Take, H., Mitani, T., Furubayashi, T., Mizutani, H., Yamamoto, N., Tandon, N. N., Sekiguchi, S., Jamieson, G. A., Kurata, T., Yonezawa, T., Tarui, S.: Identification of the platelet-specific alloantigen, Nak^a, on platelet membrane glycoprotein IV. *Blood* **75**:684, 1990.
- 18) Shibata, Y., Kim, N., Morita, S., Ishijima, A., Okazaki, S.: Monoclonal antibody OKM5 and platelet alloantibody anti-Nak^a have the same specificity. *Proc Japan Acad* **66** Ser B:41, 1990.
- 19) Yamamoto, N., Ikeda, H., Tandon, N. H., Herman, J., Tomiyama, Y., Mitani, T., Sekiguchi, S., Lipsky, R., Kralisz, U., Jamieson, G. A.: A platelet membrane glycoprotein deficiency in healthy blood donors: Nak^a- platelets lack detectable GPIV (CD36). *Blood* (in press)
-